

· 药物代谢 ·

大鼠静注葡萄内酯的药代动力学研究

袁金斌¹, 王发英², 李明¹, 陈海芳¹, 杨武亮^{1*}, 刘莹莹¹, 张瑜¹

(1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;

2. 丽水市食品药品检验所, 浙江 丽水 323000)

[摘要] 目的:建立大鼠血浆中葡萄内酯的检测方法,研究葡萄内酯在大鼠体内的药代动力学特性。方法:采用反相高效液相色谱法测定不同时间大鼠血浆中葡萄内酯的浓度,采用 DAS 2.1 软件计算药代动力学参数。结果:大鼠静脉注射葡萄内酯后 AUC 与给药剂量成正比, C_{max} 与给药剂量基本成线性关系,MRT 不随剂量增加而延长,但半衰期随剂量发生变化。结论:葡萄内酯经大鼠尾静脉注射后的体内过程符合二室模型,体内过程不完全符合线性动力学过程。

[关键词] 葡萄内酯;药代动力学;大鼠;高效液相色谱法

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)18-0130-04

Pharmacokinetic Study of Aurapetene after Intravenous Injection in Rats

YUAN Jin-bin¹, WANG Fa-ying², LI Ming¹, CHEN Hai-fang¹, YANG Wu-liang^{1*},

LIU Ying-ying¹, ZHANG Yu¹

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 2. Lishui Institute for

Food and Drug Control, Lishui 323000, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a simple HPLC method for the determination of auraptene in rats plasma, and to investigate the pharmacokinetics of auraptene after intravenous injection in rats. **Method:** The contents of auraptene in rats plasma were determined by RP-HPLC. The software DAS 2.1 was used to calculate the pharmacokinetic parameters. **Result:** After intravenous injection to rats, direct proportion was found between AUC and the doses, and linear relationship was observed between C_{max} and the doses. MRT did not extend with the doses, but the half-life time changed. **Conclusion:** The pharmacokinetics of auraptene after intravenous injection in rats are in accord with two-compartment model, the disposal process fits incompletely linear kinetics.

[Key words] auraptene; pharmacokinetics; rats; HPLC

葡萄内酯是一种香豆素化合物,广泛存在于柑

橘属植物的果皮中。文献表明,葡萄内酯具有抗炎^[1-2]、抗氧化^[3]、抗肿瘤^[1-3]及神经细胞保护活性^[4-5]。本研究小组前期进行了系统的葡萄内酯抗老年痴呆的药效学研究,结果表明葡萄内酯能明显改善老年性痴呆小鼠的学习记忆功能,该化合物具有潜在的抗老年痴呆新药开发价值。迄今为止,尚未见葡萄内酯的体内药代动力学的文献报道。本实验严格按照药物非临床药代动力学研究技术指导原则,系统研究了葡萄内酯的 SD 大鼠静注给药的药代动力学特性。

[收稿日期] 20110408(019)

[基金项目] 科技部新药创制重大专项(2009ZX09103-350);国家自然科学基金(30660230);江西省卫生厅课题(2009A057)

[第一作者] 袁金斌,博士,副教授,研究方向:中药物质基础与药代动力学, Tel: 0791-7118659, E-mail: kings008@gmail.com

[通讯作者] * 杨武亮,医学学士,教授,研究方向:中药物质基础, E-mail: yangwuliang@163.com

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1200 型液相色谱仪(美国 Agilent 公司),SIGMA-18 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司),XiangYi L500 型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.2 试剂 葡萄内酯为实验室自制,经色谱检测其纯度大于 99.5%;色谱流动相用的甲醇和乙腈为色谱纯试剂(Tidea, 美国);肝素钠(索来宝,进口分装);聚山梨酯(吐温-80),其余试剂均为分析纯。

1.3 动物 SD 大鼠(江西省大小鼠生产基地),体重 200~230 g,动物合格证号 SCXK(赣)2005-0001;饲养管理条件:塑料盒饲养,自由饮水,光照 12 h,明暗交替。

2 方法

2.1 动物分组与给药 SD 大鼠 12 只,雌雄各半,2 个同性别、体重相当的大鼠配对,交叉取血用。3 个剂量共 36 只。

实验前禁食 16 h,自由饮水。葡萄内酯以乙醇-吐温 80-生理盐水(1:1:8)溶解配成 0.5,2.0,5.0 g·L⁻¹ 3 个质量浓度。尾静脉注射给药,给药剂量为 2.5,10.0,25.0 g·kg⁻¹。

2.2 取血 采用连续交叉取血法。于给药后 3,6,10,20,30,40,50,60,70,90,120,180 min 自大鼠眼眶后静脉丛取血于已肝素化的 EP 管中。

2.3 血浆样品处理 将全血于 4 000 r·min⁻¹ 下离心 15 min 分离得到血浆。量取 100 μL 血浆,加入 500 μL 乙酸乙酯,涡旋混匀,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取乙酸乙酯层,下层再加 500 μL 乙酸乙酯同上提取,合并乙酸乙酯层,氮气吹干,残渣加 100 μL 甲醇溶解,高速离心 15 min(18 000 r·min⁻¹),上清液直接进样分析。

2.4 色谱条件 Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×200 mm,5 μm;4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.2% 甲酸(84.5:15.5),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 322 nm,进样量 20 μL。

2.5 溶液配制与标准曲线的制备 准确称取葡萄内酯 10 mg,以甲醇溶解并定容至 10 mL,配成 1.0 g·L⁻¹ 的葡萄内酯标准储备溶液。以甲醇逐次稀释上述储备溶液,得到系列浓度的标准工作溶液。

取空白血浆,依次加入上述标准工作溶液,使葡萄内酯的质量浓度分别为 0.099 9,0.499 5,2.997,9.99,19.98,39.97,59.94 mg·L⁻¹,按样品处理方法

操作、分析,根据各样品的色谱分析结果,在 Agilent 1200 工作站中以葡萄内酯峰面积对浓度进行最小二乘法线性回归,得到标准曲线。

2.6 数据分析与药动学数据处理 采用 2.4 项条件对各种样品进行色谱分析,以外标法求得葡萄内酯的浓度。将所得浓度-时间数据输入 DAS 2.1(中国药理学学会)软件,求算各药动学参数。

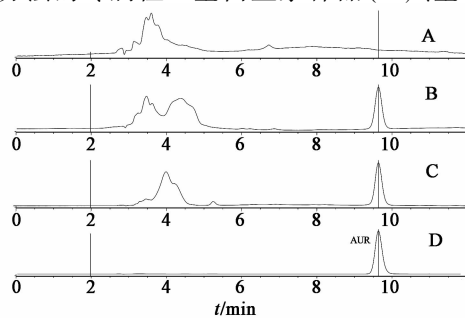
3 结果与讨论

3.1 色谱条件的确定 生物样品底质复杂,目标化合物的含量较低,对分析方法提出了较高要求。我们系统比较了:①甲醇-水、乙腈-水流动相体系;②流动相比例及梯度洗脱条件。结果显示,2 种流动相体系条件均能获得较好的色谱分离,但乙腈-水体系柱压低,对一些强保留成分的洗脱能力更强,平衡时间更短。用于定量分析时,采用乙腈-0.2% 甲酸(84.5:15.5)洗脱,分离较好,分析时间较短。

葡萄内酯为弱极性的香豆素化合物,其大气压电离质谱的离子化效率较低,质谱响应较差,而各种生物样品中的基质对其离子抑制作用使得质谱检测进一步恶化。另一方面,葡萄内酯的香豆素母核为大共轭体系,紫外响应较好。所以,本方法采用紫外检测,检测波长为葡萄内酯的最大吸收波长 λ_{max} = 322 nm。

3.2 提取方法的选择 葡萄内酯在甲醇、乙酸乙酯、乙腈等有机溶剂中溶解度较大,可以采用甲醇、乙腈直接沉淀蛋白再超速离心的方法制备样品。为提高检测灵敏度,也可以采用乙酸乙酯提取富集的方法。我们对这 3 种方法的绝对回收率进行了比较,乙酸乙酯富集的方法对葡萄内酯的绝对回收率显著大于前 2 种方法,所以本实验采用乙酸乙酯提取的方法。

3.3 方法的专属性 空白血浆样品(A)、空白血浆



A. 空白血浆;B. 空白加标样品;C. 给药后血浆样品;
D. 葡萄内酯标准溶液

图1 各种样品的典型 HPLC-UV

样品加葡萄糖内酯标准品(B)及给药后血浆样品(C)的 HPLC-UV 色谱图见图 1。葡萄糖内酯(AUR)的保留时间为 9.52 min,与各种内源性杂质呈基线分离,未见明显干扰。

3.4 线性范围与检测限 血浆样品中葡萄糖内酯的质量浓度在 0.099 9 ~ 59.94 mg·L⁻¹ 与峰面积成线性关系,回归方程为 $Y = 45.37X + 2.53$ ($R^2 = 0.99989$),定量下限为 99.9 μg·L⁻¹,以信噪比 S/N=3.0 计,检测限为 38 μg·L⁻¹。

3.5 准确度与精密度 按血浆样品制备方法制备低、中、高 3 个质量浓度(1.0, 10.0, 40.0 mg·L⁻¹)的葡萄糖内酯血浆样品,每个质量浓度 6 份,连续测定 3 d,2 次/d。结果见表 1。其平均回收率 96.9% ~ 100.7%,其日内、日间测定的 RSD < 8.9%,符合体内药物分析要求。

3.6 样品的稳定性 稳定性试验结果见表 2。精密配制低、中、高 3 个浓度的葡萄糖内酯血浆样品,分别测试其在室温放置 24 h、反复冻融 3 次、冷冻保存 1 个月及处理后室温放置 24 h 等条件下的浓度,以平行实验的相对标准偏差评价其稳定性,所得结果见表 1,表明在本实验条件下,样品的稳定性较好。

3.7 血药浓度与药动学参数考察 图 2 为 3 个剂量组的血药浓度-时间曲线,静注给药后血药浓度迅速衰减,给药 120 min 后大鼠血浆中尚可检测到原形药。根据大鼠静注不同剂量葡萄糖内酯的药时曲

表 1 血浆样品中葡萄糖内酯的稳定性

质量浓度 /mg·L ⁻¹	稳定性 RSD/%			
	室温放置 (n=6)	冻融 (n=3)	冷冻放置 (n=3)	处理后室温放置 (n=6)
1.0	5.93	6.19	11.5	8.50
10.0	6.84	7.48	7.28	7.62
40.0	5.59	4.89	3.61	3.18

线,应用 DAS 2.1 软件模拟其药动学参数。根据 AIC 最小原则、相关系数等指标进行最佳模型模拟,葡萄糖内酯经大鼠尾静脉注射后的体内过程符合二室模型,主要药代动力学参数见表 2,其中半衰期约为 0.45 h。如表 2 所示,大鼠静脉注射葡萄糖内酯后 AUC 与给药剂量呈正比, C_{max} 与给药剂量基本成线性关系, MRT 不随剂量增加而延长,但半衰期随剂量发生变化,故大鼠静脉注射葡萄糖内酯的体内过程不完全符合线性动力学过程。

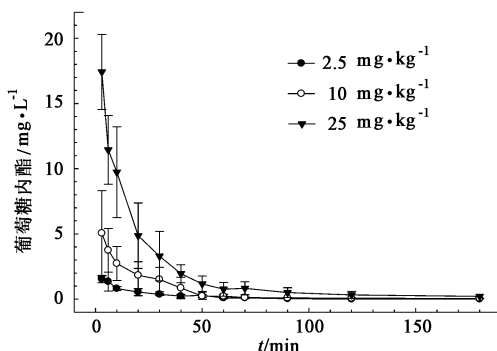


图 2 大鼠静注 3 个剂量葡萄糖内酯后的平均血药浓度-时间曲线

表 2 大鼠静脉注射葡萄糖内酯的药代动力学参数

参数	单位	房室模型			参数	单位	非房室模型		
		2.5 mg·kg ⁻¹	10 mg·kg ⁻¹	25 mg·kg ⁻¹			2.5 mg·kg ⁻¹	10 mg·kg ⁻¹	25 mg·kg ⁻¹
AUC _(0-t)	mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	0.541	2.098	5.949	AUC _(0-t)	mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	0.504	1.947	5.649
AUC _(0-∞)	mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	0.705	2.445	7.016	AUC _(0-∞)	mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	0.555	1.998	5.763
t _{1/2α}	h	0.029	0.082	0.055	MRT _(0-t)	h	0.257	0.347	0.34
t _{1/2β}	h	0.335	0.278	0.811	MRT _(0-∞)	h	0.324	0.354	0.385
V ₁	L	0.036	3.365	0.142	t _{1/2z}	h	0.205	0.709	0.418
CL	L·h ⁻¹	0.755	11.97	0.743	T _{max}	h	0.06	0.05	0.05
					CL _z	L·h ⁻¹	0.954	3.695	0.936
					V _z	L	0.285	4.533	0.481
					C _{max}	mg·L ⁻¹	1.64	5.66	17.42

单向灌流法研究叶黄素微囊的大鼠在体肠吸收

鲁萍¹, 王新春^{1,2*}, 陈文¹, 尹俊涛³

(1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002; 2. 石河子大学医学院第一附属医院, 新疆 石河子 832008;
3. 神内食品有限公司, 新疆 石河子 832000)

[摘要] 目的: 研究叶黄素微囊在大鼠在体肠吸收特性。方法: 采用单向灌流模型, 紫外分光光度法测定在体肠灌流叶黄素微囊质量浓度的变化, 研究不同肠段、不同质量浓度叶黄素微囊的吸收部位和吸收机制。结果: 叶黄素微囊在大鼠各肠段的吸收速率常数(K_a)、有效渗透系数(P_{app})是回肠 > 空肠 > 十二指肠 > 结肠, 且各肠段的 K_a , P_{app} 值无显著性差异; 灌流液中不同质量浓度叶黄素微囊的 K_a , P_{app} 值均无显著性差异。结论: 叶黄素微囊在大鼠肠道无特定吸收窗, 药物质量浓度对叶黄素微囊的 K_a , P_{app} 值无影响, 其吸收机制为被动扩散。

[关键词] 叶黄素微囊; 在体肠吸收; 单向灌流法

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0133-04

Study on Intestinal Absorption of Lutein Microcapsules in Rats by *in situ* Single Pass Perfusion Method

LU Ping¹, WANG Xin-chun^{1,2*}, CHEN Wen¹, YIN Jun-tao³

(1. Pharmacy of College, Shihezi University, Shihezi 832002 China; 2. The First Affiliated Hospital of Medical College, Shihezi University, Shihezi 832008, China; 3. Shennai Food Co. Ltd., Shihezi 832000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the *in situ* intestinal absorption behaviors of lutein microcapsules in rats.

[收稿日期] 20110510(014)

[基金项目] 科技人员服务企业行动项目(SQ2009GJG4102765)

[通讯作者] *王新春, 博士, 主任药师, 硕士生导师, 从事中药新药开发及其新型纳米给药系统研究, Tel: 0993-2855827, E-mail: cwjwxc@163.com

4 结论

本文所开发的方法专属性强, 灵敏度高, 准确可靠, 可为后续的药代动力学研究提供方法学依据。大鼠静脉注射给药的半衰期约为 0.45 h, 体内的药动学过程符合二室模型, 不完全符合线性动力学过程。

[参考文献]

- [1] Takuji Tanakak, Kunihiro Kawabata, Mikio Kakumoto, et al. Immuno-modulatory action of citrus auraptene on macrophage functions and cytokine production of lymphocytes in female BALB/c mice[J]. Carcinogen, 1997, 18(11): 2155.
- [2] Hideki Mori, Kenji Niwa, Qiao Zheng, et al. Cell proliferation in cancer prevention: effects of preventive agents on estrogen-related endometrial carcinogenesis

model and on an *in vitro* model in human colorectal cells [J]. Mut Res, 2001, 480/481(1): 201.

- [3] Kyuichi Kawabata, Akira Murakami, Hajime Ohigashi. Citrus auraptene targets translation of MMP-7 (matrilysin) via ERK 1/2-dependent and mTOR-independent mechanism[J]. FEBS Lett, 2006, 580(22): 5288.
- [4] Francesco Epifano, Gemma Molinaro, Salvatore Genovese, et al. Neuroprotective effect of prenyloxycoumarins from edible vegetables[J]. Neurosci Lett, 2008, 443(2): 57.
- [5] Kayo Kuroyanagi, Min-Sook Kang, Tsuyoshi Goto, et al. Citrus auraptene acts as an agonist for PPARs and enhances adiponectin production and MCP-1 reduction in 3T3-L1 adipocytes [J]. Biochem Biophys Research Commun, 2008, 366(1): 219.

[责任编辑 邹晓翠]